

INMOVILIZACION DE GLUCOSA OXIDASA EN NANOPELICULAS DE POLIMEROS FENILENETINILENOS SECUENCIADOS CON GRUPOS POLARES PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES OPTICOS.

E. Vázquez^{1*}, I. Moggio¹, E. Arias¹, J. Romero¹

¹Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna No. 140, 25253, Saltillo, Coah., México.
vazquezge@posgrado.ciqqa.mx

Abstract.

En este trabajo se reporta la síntesis de tres poli(fenilenetinitilenos) secuenciados con grupos polares del tipo glicol (pPEG3OC12-sqO), tioéster (pPET3OC12-sqS) y amida (pPEA3OC12-sqN) para la construcción de biosensores ópticos, estas secuencias imparten un carácter parcial iónico a los polímeros permitiendo la interacción electrostática con enzimas como la glucosa oxidasa. El estudio de la actividad enzimática en los biosensores contruidos con los tres polímeros y la enzima, indica que ésta última se fija eficientemente, aunque se obtienen valores de K_m mayores al de la enzima en solución, lo que afecta su afinidad por la glucosa. El estudio de reconocimiento molecular por fluorescencia indica que existe una variación de esta propiedad, en función de la concentración del analito. De estos resultados se deduce que es posible construir biosensores ópticos utilizando películas de polímeros a escala nanométrica.

Introducción.

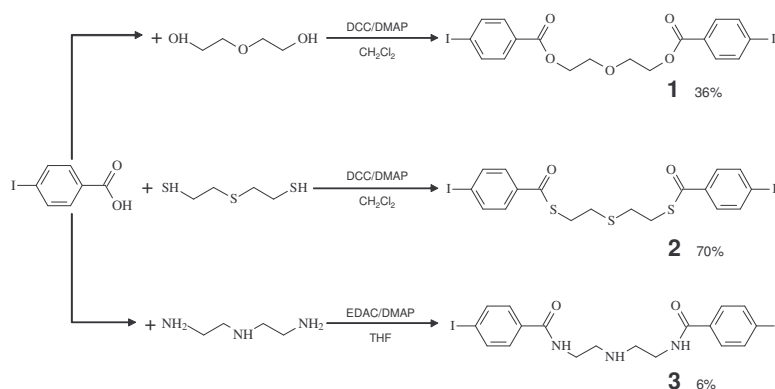
Los biosensores ópticos aprovechan variaciones en absorción de luz o emisión de fluorescencia de polímeros conjugados como los poli(fenilenetinitilenos) (PFE), de los que se han reportado algunos ejemplos de su posible aplicación en sensores químicos¹ y biológicos². En general, para que un material pueda ser utilizado en biosensores ópticos, debe contener un grupo funcional con propiedades ópticas específicas y un componente de origen biológico capaz de reconocer selectivamente a ciertas moléculas, para la detección de analitos, virus, microorganismos, etc. Una técnica sencilla que permite la elaboración de nanopelículas con una organización supramolecular bien definida, es el autoensamblaje³. Recientemente hemos encontrado que se pueden obtener multicapas con un espesor y estructura controlada, gracias a la técnica de autoensamblaje electrostático, que consiste en alternar –capas de un polímero secuenciado de tipo fenilenetinitileno portador de un grupo carboxilato con capas de poli(anilina)³. Partiendo de estos resultados, se sintetizaron PFE con grupos glicol éster (pPEG3OC12-sqO), tioéster (pPET3OC12-sqS) y amida (pPEA3OC12-sqN). Estos polímeros se utilizaron para preparar nanopelículas alternadas con capas de glucosa oxidasa para el desarrollo de un con enzimas para obtener biosensores ópticos útil en la detección de glucosa por fluorescencia. Los polímeros antes mencionados presentan ~~también~~ cadenas laterales largas de tipo alcoxi, para que imparten ~~les~~ solubilidad en solventes orgánicos comunes y así permitir la formación de películas.^{4,5}

Parte experimental:

Materiales y métodos. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico marcas Sigma, Fluka y JT Baker. Los espectros UV-visible y las cinéticas enzimáticas se realizaron ~~obtuvieron~~ en un espectrofotómetro Shimadzu 2401, utilizando aditamentos para película y para el control de temperatura respectivamente. y ~~Con los resultados obtenidos, se hicieron los cálculos correspondientes para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la glucosa oxidasa en solución e inmovilizada en las nanopelículas~~ se obtuvieron en un espectrofotómetro Shimadzu 2401 utilizando aditamentos para película y para el control de

~~temperatura respectivamente~~, los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B excitando a 10 nm por abajo del pico máximo de absorción, para la elaboración de las películas autoensambladas se utilizó el brazo mecánico de un equipo Langmuir-Blodgett KSB5000.

Síntesis de los polímeros conjugados. En la figura 1 se muestran en forma muy resumida, ~~muestran~~ las rutas sintéticas utilizadas para la síntesis ~~obtención~~ de los monómeros con secuencias polares, utilizando los agentes de deshidratación 1,3-diciclohexilcarbodiimida ~~(nombres completos y después las abreviatura)~~ (DCC)⁶ y 1-(3-



dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDAC).⁷

Figura 1. Síntesis de los monómeros 2-(2-dietilo)4,4'-bis(yodobenzoato) **1**, 2-(2-S-tiodietil)4,4'-bis(yodobenzenocarbonylato) **2** y 4-iodo-N-[2-((2-(4-iodobenzoyl)amino)etil)amino]etil benzenamida **3**.

En la figura 2 se esquematiza la síntesis de los polímeros obtenidos por condensación de tipo Sonogashira-Heck ~~Sonogashira~~.^{8,9} El monómero 1,4-dietinil-2,5-bis(dodecanoxi)benceno (**4**), se obtuvo según el método previamente reportado.³

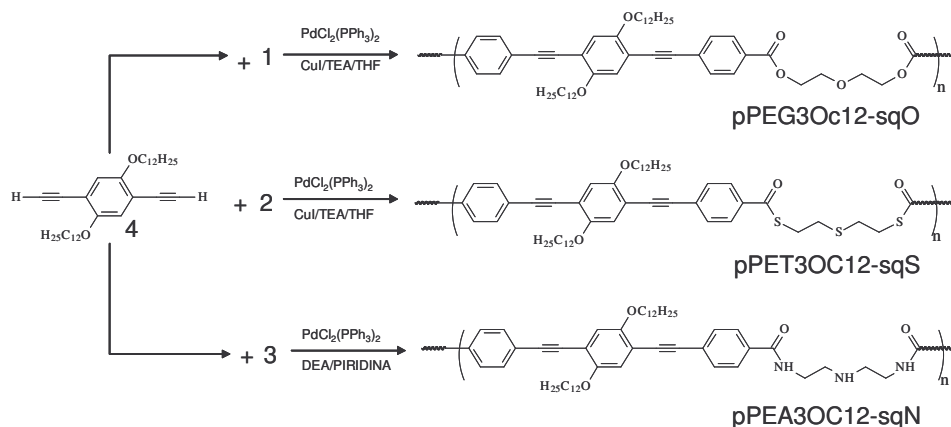
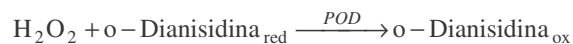
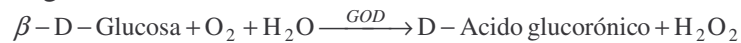


Figura 2. Ruta de síntesis de los polímeros conjugados por acoplamiento de Sonogashira-Heck ~~Sonogashira~~.

Construcción de las nanopelículas. Las nanopelículas de polímero/glucosa oxidasa, se depositaron en sustratos de cuarzo y de vidrio, para ello. ~~Para la deposición del polímero~~ Los sustratos se sumergieron en una solución de polímero (1g/L) por 10 minutos y posteriormente, se colocaron en desecador durante ~~por~~ una noche para permitir su completo secado. Una vez secada la capa de polímero depositada en el sustrato, este se sumergió, se sumergieron después las películas en una solución de glucosa oxidasa (1g/L) disuelta en buffer fosfatos

(100mM pH 5.1) por 20 minutos. Después de esto se obtuvieron películas con una configuración polímero₁/enzima₁.

Medición de la K_m y V_{max} de la glucosa oxidasa en solución e inmovilizada en nanopelículas. ~~os parámetros cinéticos de la enzima. Se determinaron~~ Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la glucosa oxidasa, se determinaron en solución y en las nanopelículas preparadas con los diferentes polímeros conjugados utilizados en este trabajo. Para su obtención se ~~utilizose~~ utilizo un método modificado de Sigma¹⁰ en donde ~~se utilizan~~ ocurren las siguientes reacciones:



~~Para En solución,~~ la determinación de K_m y V_{max} , ~~en solución~~ se llevo a cabo colocando ~~en~~ en una celda de cuarzo ~~Uv~~ los siguientes reactivos: 2.4mL de solución de o-dianisidina (0.21mM) disuelta en buffer acetatos (50mM pH 5.1), 0.1mL de una solución de peroxidasa a (60u/mL) y 0.5mL de la solución de glucosa a evaluar, (el intervalo de concentraciones utilizada fue 0.2-70mM), se mezclo por inmersión y se coloco en el portaceldas con control de temperatura a 35°C hasta que la absorbancia fue constante, después se agregarón ~~o~~ 0.1mL de la solución de glucosa oxidasa (50u/mL) a la celda, se mezclo por inmersión y se midió el cambio de absorbancia durante ~~por~~ 4 minutos. Se grafica el ~~El~~ cambio de absorbancia se grafico versus ~~contra~~ el tiempo de reacción, para obtener y de la gráfica obtenida se obtiene la ecuación de primer orden $Y=mX+b$, donde m representa la velocidad de la reacción. Con los datos de velocidad de reacción obtenidos para cada concentración de glucosa se estos datos se construyo una ~~Después se obtiene la~~ gráfica del tipo Lineweaver-Burke, graficando el recíproco de las concentraciones de sustrato utilizadas, contra el ~~versus el~~ recíproco de las velocidades de reacción obtenidas y a partir de la curva aquí, de este gráfico se obtiene la ~~una~~ la ecuación de primer orden, donde V_{max} y K_m se calculan con las ecuaciones: $V_{max} = \frac{1}{b}$ y

$$K_m = mV_{max}.$$

Para la medición de K_m y V_{max} en las nanopelículas construidas con los diferentes polímeros, se utilizó la misma mezcla de reacción utilizada en las determinaciones de la reacción de la glucosa oxidasa en solución, solo que en este caso no se adicioneó pero sin agregar la glucosa oxidasa. esta la enzima, en solución, sino En estas determinaciones, que primero se midió la absorbancia de la mezcla, para obtener el valor de ~~indicando~~ la concentración inicial de o-dianisidina oxidada, después en la mezcla de reacción se sumergió la película conteniendo la enzima inmovilizada, se sumergió y agitó en agitándola ~~la mezcla~~ por intervalos de 2 minutos, a continuación se retiro de la celda de cuarzo se sacó y se ~~se~~ se midió la absorbancia, este procedimiento se repitió hasta los 20 minutos, ~~con la enzima inmovilizada~~ el intervalo de concentraciones de glucosa utilizado fue de 0.55-46mM.

Evaluación de los dispositivos fluorescentes como Biosensores ópticos, en la determinación de glucosa. Se construyeron dispositivos con la configuración polímero₁/enzima₁ previamente descrita, para evaluar su respuesta a el cambio de la intensidad de la fluorescencia en presencia de diferentes concentraciones de glucosa, se prepararon las soluciones de glucosa de (0, 9, 27, 90, 270 y 810 mg/dL) disuelta en buffer acetatos (100mM pH 5.1). Para el pPEG3OC12-sqO se excitó a a 374nm, para el pPET3OC12-sqS a 382nm y para el pPEA3OC12-sqN a 376nm. Se midió la intensidad de

fluorescencia de las películas antes (I_a) y durante (I_d) el contacto con la solución de glucosa. El cambio en la intensidad de la fluorescencia ~~La respuesta se mide graficando los valores obtenidos con la ecuación: ($\Delta I = I_d - I_a$) se grafico versus~~ ~~contra~~ la concentración de sustrato, ~~donde I_d es la intensidad de la fluorescencia al estar en contacto el dispositivo con la solución de glucosa y I_a es la intensidad de la fluorescencia antes del contacto.~~

Resultados y discusión.

Síntesis. En la síntesis de los compuestos 1 y 2 se utilizó la DCC como agente deshidratante, sin embargo estas condiciones ~~no~~ resultaron ~~favorables para la obtención del~~ ~~ser inadecuadas para la síntesis del~~ compuesto 3, ~~debido a que se obtenía~~ ~~resultando~~ un producto ~~muy poco soluble y difícil de separar de la.~~ Con la DCC se obtenía el producto, pero debido a que el producto obtenido era muy poco soluble, la separación de éste de la hidroxurea formada durante la síntesis, ~~con la DCC, también insoluble era difícil.~~ Utilizando EDAC como agente deshidratante en lugar de la DCC ~~Después de varias pruebas, se logró finalmente en la sustitución nucleofílica, se obtiene una hidroxurea soluble, la cual se elimina lavando el monómero con la mezcla de solventes THF/ CH_2Cl_2 consiguió obtener el monómero puro y la eliminación de la hidroxurea mediante lavados con la mezcla de solventes THF/ CH_2Cl_2 , al utilizar en la sustitución nucleofílica el EDAC como agente deshidratante en lugar de la DCC.~~ La utilización del EDAC permitió la obtención de una hidroxurea soluble en mezcla THF/ CH_2Cl_2 con lo cual a través de lavados se pudo purificar fácilmente el monómero. ~~En la síntesis del pPEA3OC12-sqN y De~~ Debido también a la poca solubilidad del compuesto 3 se utilizaron disolventes con alta polaridad ~~en la síntesis del pPEA3OC12-sqN, esta síntesis se llevo a cabo del mismo modo que para en la síntesis del pPEA3OC12-sqN, ésta se llevo a cabo de la misma manera que para~~ los polímeros pPEG3OC12-sqO y pPET3OC12-sqS ~~se sintetizaron de igual forma, mediante por~~ policondensación catalizada por Pd, utilizando ~~los~~ derivados de yoduro de arilo (compuestos 1-3) y de arilacetileno (compuesto 4), reacción conocida como acoplamiento de ~~Sonogashira-Heck, Sonogashira~~^{8,9} ~~solo que~~ en el caso del polímero con amida se elimino el uso del CuI para evitar su acomplejamiento con las amidas y ~~que esto pudiera la contaminación ar~~ ~~adel~~ polímero. ~~Se confirmo la estructura de los monómeros y polímeros por RMN, ^1H y ^{13}C .~~

Propiedades ópticas. ~~La~~ caracterización ~~espectroscopica~~ por ~~UV-Vis y fluorescencia en solución de los~~ polímero pPEA3OC12-sqN ~~s en solución se realizó en THF. Se realizo la caracterización de los polímeros en solución, para el pPEA3OC12-sqN en THF y los otros dos polímeros en y CHCl_3 , para los otros dos polímeros en CHCl_3 .~~ Estos análisis también se realizaron y en las películas monocapa. ~~por espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia. Todas las propiedades ópticas se resumen e~~ En la Tabla 1 ~~se presentan los valores de los picos máximos de absorción de los polímeros en solución y en película. Se destacan En absorción los espectros presenta~~ dos picos, ~~;~~ el primero alrededor de 320nm, se atribuye a los anillos bencénicos substituidos con dodecanoxi, mientras que el pico a mayor longitud de onda se atribuye a las transiciones $\pi-\pi^*$ de toda la conjugación. ~~Los espectros de fluorescencia, indican la presencia de una sola banda de emisión En emisión, se observa una sola banda,~~ centrada en la región azul verde, ~~al comparar~~ Las propiedades ópticas ~~observadas en las películas monocapa de los polímeros, son muy similares análogas a las discutidas en solución, con menores cambios no se puede observar,~~ los máximos ~~sea~~ de absorción o de emisión, ~~sufren un ligero desplazamiento se desplazan~~ a mayores longitudes de onda con respecto a las

observadas en soluciones, como se esperaba debido a efectos del estado sólido en estos materiales.

Tabla 1. Longitudes máximas de absorción y emisión para los polímeros conjugados. Resultados en la caracterización de absorbancia y fluorescencia de los polímeros tanto en solución y como en película.

Polímero	λ abs (nm) solución	λ em. (nm) solución	λ abs (nm) película	λ em. (nm) película	ϵ L/g*cm
pPEG3OC12-sqO	319, 384	447	324, 390	493	35
pPET3OC12-sqS	327, 394	458	333, 405	504	50
pPEA3OC12-sqN	318, 379	450	321, 380	490	22

Determinaciones de la K_m y V_{max} para la glucosa oxidasa en solución e inmovilizada. En la medición de los parámetros cinéticos. Un resumen de los valores obtenidos se presenta en la tabla 2, se muestra que, como se puede observar, la K_m de la enzima inmovilizada, es mayor que la obtenida con la glucosa oxidasa libre, esto indica que la afinidad de la enzima por el sustrato disminuye, posiblemente debido a que la formación del complejo enzima-sustrato es menos estable que en solución, disminuyendo por lo mismo así la velocidad de formación del producto, lo que se como lo confirma con los valores de velocidad máxima obtenidos. También se puede observar que los valores de K_m y V_{max} son muy similares entre los tres polímeros, lo que indica que no hay un efecto del heteroátomo en el tipo de polímero utilizado sobre la actividad de la enzima.

Tabla 2. Valores de K_m y V_{max} de la glucosa oxidasa en solución y con en los dispositivos construidos utilizando los polímeros conjugados, con los polímeros.

	K_m	V_{max}
Glucosa oxidasa en solución	21.45mM	0.014/seg
pPEG3OC12-sqO + GO	43.18mM	0.003/seg
pPET3OC12-sqS + GO	45.83mM	0.003/seg
pPEA3OC12-sqN + GO	41.00mM	0.001/seg

Evaluación de los dispositivos como biosensores ópticos en la determinación de la concentración de glucosa. En la figura 3, se muestran las curvas de la respuesta obtenidas en cada uno de los tres tipos de dispositivos construidos con la glucosa oxidasa inmovilizada. El dispositivo que alcanza una respuesta lineal a mayor concentración de glucosa, fue observado que el dispositivo que funciona mejor como biosensor es el fabricado con el polímero pPET3OC12-sqS, el cual dio respuesta lineal a la glucosa debido a que la respuesta lineal se alcanzó hasta una concentración de 270mg/dL, mientras que con el pPEG3OC12-sqO la respuesta lineal se obtuvo hasta 90mg/dL de glucosa y con pPEA3OC12-sqN la respuesta lineal se presentó hasta la concentración 27mg/dL, aunque a esta concentración y sin embargo con este último polímero se presentó el mayor cambio en la intensidad de fluorescencia.

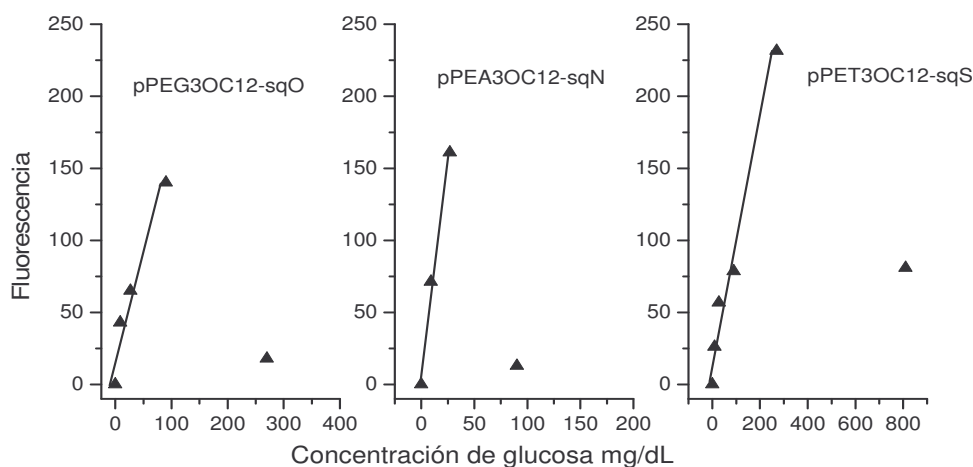


Figura 3. Respuesta de los biosensores a las soluciones de glucosa.

Conclusiones. Con los resultados obtenidos se concluye que es posible construir biosensores de tipo ópticos para la determinación de glucosa, utilizando poli(fenilenetilenos) con secuencias polares. Los dispositivos construidos con la configuración polímero conjugado / glucosa oxidasa₁ debido a que todos los dispositivos construidos presentan actividad enzimática conservan la actividad enzimática, además, se ha demostrado ~~ado~~ que la intensidad de la fluorescencia del polímero, varía proporcionalmente con la concentración del sustrato.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo de CONACYT al proyecto 43166-R y por la beca 170338.

Bibliografía.

1. U.H.F. Bunz *Chem. Rev.* 2000, 100, 1605.
2. M.D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 126, 13343.
3. C. Esinosa-Gonzalez, I. Moggio, E. Arias-Marin, J. Romero-Garcia, R. Cruz-Silva, J. LeMoigne, J. Ortiz-Cisneros *Synth. Met.* 2003, 139, 157.
4. E. Arias-Marin, J. LeMoigne, T. Maillou, D. Guillon, I. Moggio, B. Geffroy *Macromolecules* 2003, 36, 3570.
5. C. Weder, M. S. Wrighton *Macromolecules* 1996, 29, 5157.
6. B. Vanhaecht; M.N. Teerenstra; D.R. Suwier; C.E. Koning *J.M.S. Pure Appl. Chem.*, A 2000, 37, 633
7. X. Zhang, M. Breslav, J. Grimm, K. Guan, A. Huang, F. Liu, C. A. Maryanoff, D. Palmer, M. Patel, Y. Qian, Ch. Shaw, K. Sorgi, D. Xu *J. Org. Chem.* 2002, 67, 9471.
8. H. A. Dieck, R.F. Heck *J. Organomet. Chem.* 1975, 93, 259.
9. K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara *Tetrahedron Lett.* 1975, 50, 4467.
10. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/enzyme%20assay/g7141enz.pdf>